

Es ist heute fast schon selbstverständliches Wissen, daß der Zellkern in Ausübung seiner genetischen Funktion „Nachrichten“ an die Zelle abgibt; das soll daher hier nicht näher diskutiert werden. Auffällig scheint nur eine gewisse Uniformität solcher „Antworten“ des Zellkerns, in dem offenbar die verschiedensten Anlässe wie Wach-

tum, Hormone, Viren, Ernährung, stets die prinzipiell gleiche Kausalkette — Genaktivierung  $\rightarrow$  RNS-Synthese  $\rightarrow$  Proteinsynthese — auszulösen scheinen. Wer hier nach molekularen Mechanismen sucht, findet sicher ein reiches Betätigungsfeld.

### Literatur

1. CHAUVEAU, J., Y. MOULÉ und C. ROUILLER, *Exp. Cell Res.* **11**, 317 (1956). — 2. BEHRENS, M., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **209**, 59 (1932). — 3. SIEBERT, G., J. G. VILLALOBOS jr., T. S. RO, W. J. STEELE, G. LINDENMAYER, H. ADAMS und H. BUSCH, *J. biol. Chemistry* **241**, 71 (1966). — 4. CONQVER, T. E. und G. SIEBERT, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **99**, 1 (1965). — 5. LANGENDORF, H., G. SIEBERT, I. LORENZ, R. HANNOVER und R. BEYER, *Biochem. Z.* **335**, 273 (1961). — 6. SIEBERT, G., H. LANGENDORF, R. HANNOVER, D. NITZ-LITZOW, B. C. PRESSMAN und C. MOORE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **343**, 101 (1965/66). — 7. REID, E., A. A. EL-AASER, M. K. TURNER und G. SIEBERT, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **339**, 135 (1964). — 8. SIEBERT, G., G. B. HUMPHREY, H. THEMANN und W. KERSTEN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **340**, 51 (1965). — 9. SCHUEL, H. und N. G. ANDERSON, *J. Cell Biol.* **21**, 309 (1964). — 10. NEIL, M. W. und M. W. HOMER, *Biochem. J.* **92**, 217 (1964); **93**, 220 (1964). — 11. SHIBKO, S. und A. L. TAPPEL, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **73**, 76 (1963). — 12. SIEBERT, G., K. KESSELRING, R. BEYER, K.-H. BÄSSLER und B. C. PRESSMAN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, in Vorbereitung. — 13. SIEBERT, G. und G. B. HUMPHREY, *Advances in Enzymol.* **27**, 239 (1965). — 14. BAKAY, B., G. SIEBERT und S. SOROF, *Cancer Res.*, in Vorbereitung. — 15. ROBERTSON, J. D., *Biochem. Soc. Symposia* **16**, 3 (1959). — 16. GILBERT, I. G. F. und J. M. RADLEY, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **79**, 575 (1964). — 17. KROEGER, H., *Nature* (London) **200**, 1234 (1963). — 18. SIEBERT, G., *Biochem. Z.* **334**, 369 (1961). — SIEBERT, G., K.-H. BÄSSLER, R. HANNOVER, E. ADLOFF und R. BEYER, *Biochem. Z.* **334**, 388 (1961). — 19. KEIR, H. M., R. M. S. SMELLIE und G. SIEBERT, *Nature* (London) **196**, 752 (1962). — 20. BEHKI, R. M. und W. C. SCHNEIDER, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **68**, 34 (1963). — 21. BAKAY, B. und S. SOROF, *Cancer Res.* **24**, 1814 (1964). — 22. REID, E. und G. SIEBERT, unveröffentlicht. — 23. KOHEN, E., G. SIEBERT und C. KOHEN, *Histochemie* **3**, 477 (1964). — 24. SIEBERT, G., I. SCHADE und H. ZEIDLER, unveröffentlicht. — 25. TSUKADA, K. und I. LIEBERMAN, *J. biol. Chemistry* **239**, 2952 (1964). — 26. LERMAN, M. I., V. L. MANTIEVA und G. P. GEORGIEV, *Biochimija* **29**, 518 (1964). — 27. RO, T. S., M. MURAMATSU und H. BUSCH, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **14**, 149 (1964). — 28. BIRNSTIEL, M. L., E. FLEISSNER und E. BOREK, *Science* (New York) **142**, 1577 (1963). — 29. COMB, D. G. und S. KATZ, *J. molecular Biol.* **8**, 790 (1964). — 30. BRANDT, E. E. und F. J. FINAMORE, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **68**, 618 (1963). — 31. VILLALOBOS, jr., J. G., W. J. STEELE und H. BUSCH, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **17**, 723 (1964); *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **91**, 233 (1964).

Professor Dr. med. G. Siebert  
65 Mainz  
Postfach 606

## Die Bestimmung der $\beta$ -Glucuronidase im Serum und im Urin

Von R. RICHTERICH und H. DAUWALDER

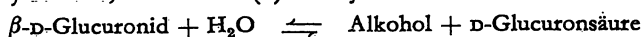
*Aus dem Chemischen Zentrallaboratorium des Inselspitals (Direktor: PD Dr. R. Richterich) und der Kinderklinik der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. E. Rossi)*

(Eingegangen am 14. Juni 1965)

Es wird eine einfache Methode zur Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase in Körperflüssigkeiten beschrieben. Als Substrat dient Phenolphthalein-Glucuronid und die Messung erfolgt durch den Nachweis des abgespaltenen Phenolphthaleins. Eine Enteiweißung ist nicht notwendig. Die Normalwerte für menschliches Serum und Urin werden in Internationalen Einheiten zusammengestellt.

A simple method for an assay of  $\beta$ -Glucuronidase in body fluids is described. Phenolphthalein glucuronide is used as a substrate and the liberated phenolphthalein is measured colorimetrically. The normal values for  $\beta$ -glucuronidase in human serum and urine are given in International Units.

Die  $\beta$ -Glucuronidase ( $\beta$ -D-Glucuronid-Glucuronohydrolase, EL 3.2.31 (1)) katalysiert die Reaktion:



In der klinischen Chemie werden zur Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase vor allem zwei Methoden verwendet:

1. Einsatz von Phenolphthalein-Glucuronid als Substrat und photometrische Bestimmung des freigesetzten Phenolphthaleins durch Messung der Eigenfarbe dieses Indikators im alkalischen Bereich (2, 3).

2. Einsatz von 6-Brom-2-Naphthyl- $\beta$ -D-Glucopyruronosid als Substrat und photometrische Bestimmung der abgespaltenen aromatischen Komponente nach Überführung in einen Azofarbstoff (4).

Die erste Methode ist einfacher, rascher und weniger störanfällig. Wir geben ihr daher den Vorzug. Im Gegensatz zu den meisten Autoren (3, 5) führen wir die Bestimmung ohne vorhergehende Enteiweißung, aber nach Zentrifugation durch (2, 6).

## Methodik

### Prinzip

1. Inkubation von Phenolphthalein-Glucuronid mit dem Untersuchungsmaterial bei pH 4,5 und 37° während 4 Stdn.
2. Unterbrechung der enzymatischen Reaktion und Alkalisierung durch Zusatz von Glykokoll-NaOH-Puffer.
3. Messung der Extinktion des freigesetzten Phenolphthaleins bei 546 m $\mu$ .
4. Berechnung des Resultates mit Hilfe eines mitgeführten Phenolphthalein-Standards.

### Ansatz

Phenolphthalein-Glucuronid 3,57 mMol., pH 4,5; Citrat-Puffer 42 mMol pH 4,5; Analyse 0,1 ml, Inkubationsdauer 240 Min., Inkubations-Temperatur 37°.

### Chemikalien

Phenolphthalein-Glucuronid (freie Säure): C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>; Mol.-Gew. 494,43; Phenolphthalein: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>; Mol.-Gew. 318,31.

### Reagenzien

Citrat-Puffer 50 mMol pH 4,5: 28 ml/ 0,1 M Citronensäure und 22 ml/ 0,1 M Natrium-Citrat werden mit destilliertem Wasser auf 100 ml gelöst.

Glykokoll-NaOH-Puffer 100 mMol pH 11,0: 51 ml/ 0,1 M Glykokoll-Lösung und 0,1 M Natriumchlorid-Lösung werden mit 49 ml/ 0,1 M Natronlauge gemischt. Als Konservierungsmittel kann 1 ml Chloroform oder Thymol-Isopropanol zugesetzt werden.

Substrat-Lösung 5 mMol pH 4,5: 247 mg Phenolphthalein-Glucuronid mit Citrat-Puffer auf 100,0 ml lösen. Gefroren aufbewahren.

Standard-Lösung 126  $\mu$ Mol: 4 mg Phenolphthalein mit Äthanol auf 100,0 ml lösen.

### Vorgehen

Ansatz in ml	A	AL	RL	S
Substrat-Lösung	0,5	—	0,5	—
Citrat-Puffer	—	0,5	—	0,5
Analyse	0,1	0,1	—	—
DM-Wasser	—	—	0,1	—
Standard-Lösung	—	—	—	0,1
Mit Parafilm verschlossen während 240 Min. im Wasserbad bei 37° inkubieren.				
Glykokoll-NaOH-Puffer	1,0	1,0	1,0	1,0

Gut mischen und scharf zentrifugieren und die Extinktion des Überstandes bei 546 m $\mu$  gegen DM-Wasser ablesen.

### Berechnung

$$IU = \frac{E(A) - A(AL) - E(RL)}{E(S)} \cdot C_m(S) \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{t} \mu\text{Mol Min.}^{-1} l^{-1}$$

$$IU = \frac{E(A) - A(AL) - E(RL)}{E(S)} \cdot (126 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-6} \cdot \frac{1}{240} \mu\text{Mol Min.}^{-1} l^{-1})$$

$$IU = \frac{E(A) - E(AL) - E(RL)}{E(S)} \cdot 0,525 \mu\text{Mol Min.}^{-1} l^{-1}$$

### Spezifität

**Serum:** Die Methode ist an sich spezifisch für  $\beta$ -Glucuronidase. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob in den Körperflüssigkeiten nur ein einziges Enzym dieses Typs vorkommt oder ob mehrere Enzym-Species mit ähnlicher katalytischer Wirkung vorkommen (Heterogenität).

**Urin:** Ob die im Urin vorkommende  $\beta$ -Glucuronidase ein einheitliches Enzym darstellt oder ob verschiedene molekulare Species vorkommen, ist bisher nicht geklärt.

### Stabilität

**Serum:** Die Serum- $\beta$ -Glucuronidase gehört zu den stabilsten Serum-Enzymen. In gefrorenem Zustand bleibt ihre Aktivität unbeschränkt haltbar, bei Zimmertemperatur ist nach 48 Stdn. mit einem Aktivitätsverlust von etwa 10% zu rechnen.

**Urin:** BOYLAND und Mitarbeiter (11) fanden keine Aktivitäts-Einbuße der Urin- $\beta$ -Glucuronidase beim Aufbewahren bei Zimmertemperatur oder 5° während 6 Tagen. Dennoch empfiehlt sich ein Zusatz von Thymol-Benzol (10) oder Thymol-Isopropanol (15) als Urin-Konservierungsmittel.

## Ergebnisse

### Normalwerte

#### Serum

Probanden	N	IU ( $\mu$ Mol Min. <sup>-1</sup> l <sup>-1</sup> )	Literaturzitat
Männer	16	0—0,095 <sup>1)</sup>	3
	10	0,118 $\pm$ 0,12 <sup>2)</sup>	8
	6	0,164 (0,131—0,288) <sup>3)</sup>	9
	18	0,120 (0,030—0,270) <sup>4)</sup>	13
Frauen	16	0—0,120 <sup>1)</sup>	3
	10	0,168 $\pm$ 0,13 <sup>2)</sup>	8
	14	0,164 (0,052—0,248) <sup>3)</sup>	9
	18	0,120 (0,030—0,270) <sup>4)</sup>	13
Gravide, 1. Trimester	2	0,186 (0,136—0,236) <sup>3)</sup>	9
Gravide, 2. Trimester	10	0,335 (0,157—0,524) <sup>3)</sup>	9
Gravide, 3. Trimester	21	0,471 (0,157—0,812) <sup>3)</sup>	9
Gravide, Wehenbeginn	27	0,453 (0,262—0,706) <sup>3)</sup>	9
Gravide, Geburt	24	0,488 (0,262—1,020) <sup>3)</sup>	9
Wöchnerinnen,			
7 Tage post partum	20	0,208 (0,162—0,288) <sup>3)</sup>	9
Menopause	20	0,275	
Nabelschnurblut	46	0,181 (0,116—0,294) <sup>3)</sup>	9

<sup>1)</sup> Statistisch nicht ausgewerteter Streubereich.

<sup>2)</sup>  $\bar{x} \pm 2s$ .

<sup>3)</sup>  $\bar{x}$  (statistisch nicht ausgewerteter Streubereich).

<sup>4)</sup>  $\bar{x}$  (graphisch ermittelter 2—98% Bereich).

### Urin

Alle folgenden Angaben wurden auf Grund von Bestimmungen mit Phenolphthalein-Glucuronid als Substrat erhalten und in IU, d. h.  $\mu$ Mol Min.<sup>-1</sup> (37°) umgerechnet.

Probanden	N	IU ( $\mu$ Mol Min. <sup>-1</sup> l <sup>-1</sup> )	Literaturzitat
Kontrollen	10	0,049 (0,034—0,099) <sup>1)</sup>	10
Kontrollen (Urin steril)	25	0,020 (0,008—0,060) <sup>2)</sup>	11
Kontrollen (Urin infiziert)	16	0,028 (0,008—0,048) <sup>2)</sup>	11
Kontrollen	24	0,088 (0,063—0,126) <sup>2)</sup>	12
Kontrollen		0,170 (0,040—0,450) <sup>2)</sup>	13
IU ( $\mu$ Mol Min. <sup>-1</sup> pro 24 Stdn.)			
Kontrollen	10	— 0,147	10
Kontrollen	24	0,105 (— 0,157) <sup>1)</sup>	12

<sup>1)</sup>  $\bar{x}$  (Streubereich).

<sup>2)</sup>  $\bar{x}$  (graphisch ermittelter 2—98% Bereich).

## Diskussion

Die optimalen Bedingungen dieses Enzymes in den Körpersäften sind noch wenig untersucht. Als Optimum für das Serum-Enzym wird pH 4,1—5,2 angegeben (6). Unter den angegebenen Bedingungen gilt die Enzym-Umsatz- und Zeit-Umsatz-Regel für den normalen und pathologischen Bereich.

Bleibt die Analyse nach der Zentrifugation noch trübe, so ist die Bestimmung zu wiederholen. Nach der Inkubation werden alle Ansätze mit 1,0 ml/ 0,33 n Perchlorsäure enteiweißt, der Überstand neutralisiert und dann 1 ml/ des Überstandes mit Glykokoll-NaOH-Puffer versetzt. Bei der Enteiweißung ist mit Verlusten an Phenolphthalein, d. h. mit einer reduzierten Enzym-Aktivität zu rechnen (6).

Erythrocyten enthalten keine  $\beta$ -Glucuronidase, d. h. geringe Hämolyse stört bei der Bestimmung nicht (3).

Die meisten Aktivitäts-Angaben in der Literatur sind in Fishman-Einheiten (3), FU, ausgedrückt. 1 FU entspricht derjenigen Enzym-Menge, die in 1 Std. 1  $\mu$ g Phenolphthalein aus Phenolphthalein-Glucuronid freisetzt. Als Bezugsgröße wird in der Regel 1 ml/ (Urin) oder 100 ml/ (Serum) verwendet. Der Umrechnungs-Faktor von FU in IU lautet:

$$1 \text{ FU} = \frac{1}{\text{MG}} \cdot \frac{1}{t} \cdot 1000 \mu\text{Mol Min.}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ (Urin), d. h.}$$

$$1 \text{ FU} = \frac{1}{318,31} \cdot \frac{1}{60} \cdot 1000 \mu\text{Mol Min.}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ (Urin) oder}$$

$$1 \text{ FU} = 0,0523 \mu\text{Mol Min.}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ (Urin).}$$

Für Serum (100 ml/ Bezugsgröße) heißt die Formel

$$1 \text{ FU} = 0,000523 \mu\text{Mol Min.}^{-1} \text{ l}^{-1}.$$

Im Prinzip kann die Bestimmung auch nach dem Absolut-Meßprinzip durchgeführt werden, d. h. bei der Verwendung geeichter Pipetten, von Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und monochromatischem Licht von 546 m $\mu$  kann auf das Mitführen eines Standards verzichtet werden. Von einem solchen Vorgehen ist im vorliegenden Falle jedoch abzuraten, da geringe pH-Verschiebungen zu großen Fehlern führen können. Als molarer Extinktions-Koeffizient für Phenolphthalein in alkalischer alkoholischer Lösung wird 33550 angegeben (7).

Menschliches Serum hat eine gewisse Hemmwirkung auf die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase (8). Unter den vorliegenden Meßbedingungen führt dieses jedoch nicht zu einer Störung der Bestimmung.

Die Mehrzahl der Autoren konnten im Urin keinen Inhibitor der  $\beta$ -Glucuronidase nachweisen (11, 13). Der besonders von italienischen Autoren beobachtete Verdünnungs-Effekt (14) ist wahrscheinlich durch die Versuchs-Anordnung bedingt.

Die Enzym-Ausscheidung im Urin ist starken Tageschwankungen unterworfen (11). Eine Beziehung zur Zellzahl ist nicht nachzuweisen, obschon das Urin-Sediment mehr  $\beta$ -Glucuronidase als der abzentrifugierte Überstand enthält (11).

Der Ursprung der Urin- $\beta$ -Glucuronidase ist noch ungenügend geklärt. Ein Teil dürfte aus dem Plasma stammen, ein weiterer Teil aus den ableitenden Harnwegen. Dafür sprechen einerseits die schlechte Korrelation mit der Kreatinin-Ausscheidung (12, 13), andererseits die Beobachtung, daß Blasenspülwasser ansehnliche Enzym-mengen enthält (12).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung des „Schweizerischen Nationalfond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung“ durchgeführt.

## Literatur

1. Report of the Commission on Enzymes of the International Union for Biochemistry. Revised edition. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam-London-New York (1964). — 2. TALALAY, P., W. H. FISHMAN und C. HUGGINS, J. biol. Chemistry 166, 757 (1956). — 3. FISHMAN, W. H., B. SPRINGER und R. BRUNETTI, J. biol. Chemistry 173, 449 (1948). — 4. GOLDBARG, J. A., E. P. PINEDA, B. M. BANKS und A. M. RUTENBURG, Gastroenterology, Baltimore 36, 193 (1959). — 5. FISHMAN, W. H. in: Methoden der enzymatischen Analyse, herausgeg. von H. U. Bergmeyer. S. 869. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Bergstr. (1962). — 6. GOLDSTEIN, G., Clin. Chem. (New York) 7, 136 (1961). — 7. ALLEN, J., B. GARTSIDE und C. A. JOHNSON, J. Pharmacy Pharmacol. 14, 73 (1962). —

8. DOHRMANN, R. E. und H. J. UHLES, Klin. Wschr. 41, 527 (1963). — 9. KASDON, S. C., P. ROMANO und A. HATZIMICHAEL, Obstetrics and Gynecology (New York) 15, 367 (1960). — 10. MELICOW, M. M., A. C. USON und R. LIPTON, J. Urol., Baltimore 86, 89 (1961). — 11. BOYLAND, E., D. M. WALLACE und D. C. WILLIAMS, Brit. J. Cancer 9, 62 (1955). — 12. KERR, W. K., M. BARKIN, J. D'Aloisio und Z. Menczyk, Cancer 16, 633 (1963). — 13. APPERT, O. und R. RICHTERICH, in Vorbereitung. — 14. MATTEA, E., E. PIETRA und M. R. VIOLA, Tumori 45, 402, 229, 239 (1959). — 15. RICHTERICH, R., Klinische Chemie, Theorie und Praxis. S. Karger AG., Basel-New York (1964).

Priv.-Doz. Dr. R. Richterich  
Med.-Chem. Institut der Universität  
Bern (Schweiz), Bülhstr. 28